

Renata Langfort, Małgorzata Szolkowska, Ewa Szczepulska-Wójcik, Beata Maksymiuk

Zakład Patomorfologii, Instytut Gruźlicy i Chorób Płuc w Warszawie
Kierownik: dr n. med. R. Langfort

Zalecenia dotyczące oceny mikroskopowej małych wycinków i rozmazów cytologicznych w diagnostyce raka niedrobnokomórkowego płuca na podstawie rekomendacji przedstawionych przez IASLC/ATS/ERS

Small biopsies and cytologic specimens management in microscopic diagnosis and subtyping of non-small cell lung cancer, as recommended by IASLC/ATS/ERS

Praca wykonana w ramach działalności statutowej Instytutu Gruźlicy i Chorób Płuc w Warszawie

Pneumonol. Alergol. Pol. 2011; 80, 2: 172–177

Zdecydowana większość pierwotnych raków płuca jest rozpoznawana w późnym etapie zaawansowania choroby, w którym jedynym skutecznym sposobem postępowania jest stosowanie chemio- czy radioterapii. Dotychczas najistotniejszym kryterium koniecznym do podjęcia dalszego leczenia było różnicowanie na niedrobnno- i drobnokomórkowego raka płuca, natomiast odróżnienie podtypów nieoperacyjnego raka niedrobnokomórkowego (NSCLC, *non-small cell lung cancer*) nie miało znaczenia dla wyboru metody leczenia. Wprowadzenie w ostatnich latach nowych metod terapii spowodowało konieczność precyzyjniejszego określenia podtypu NSCLC [1, 2].

Do tej pory zasady różnicowania pierwotnych raków płuca były przedstawione w klasyfikacji *World Health Organization* (WHO) „Guzów płuca, opłucnej, grasicy i serca” z 2004 roku i opierały się głównie na standardowym barwieniu H+E (hematoksylina i eozyna), w niektórych przypadkach również na diagnostyce histochemicznej, mającej na celu wykrycie śluzu w komórkach raka. Reakcje immunohistochemiczne były głównie zalecane do potwierdzenia czynności neuroendokrynnej raka, wyodrębnienia raków mięsakowatych płuca oraz w różnicowaniu raka płuca naciekającego opłucną z międzybłoniakiem [3].

Wytyczne proponowane przez WHO odnoszą się przede wszystkim do materiału pooperacyjnego, w którym istnieje możliwość przebadania wielu fragmentów guza [2]. Małe wycinki lub rozmazy cytologiczne mogą być niereprezentatywne dla całości zmiany i nie zawsze zawierają charakterystyczne cechy morfologiczne pozwalające na określenie podtypu NSCLC [1, 2]. Ponadto arbitralnie ustalone kryteria rozpoznania niektórych typów raka (gruczolowo-płaskonabłonkowego, mięsakowatego) wymagają stwierdzenia 10-procentowego utkania charakterystycznego dla danej postaci nowotworu, co zwykle wiąże się z koniecznością oceny większego materiału tkankowego [3].

Wprowadzone rekomendacje przedstawiają algorytm postępowania z drobnymi wycinkami i preparatami cytologicznymi w celu odróżnienia raka gruczolowego (ADC, *adenocarcinoma*) i płaskonabłonkowego (SQCC, *squamous cell carcinoma*) [1] (tab. 1). Podkreślają konieczność rozważnego dysponowania materiałem cytologicznym i tkankowym przy wyborze barwień dodatkowych i reakcji immunohistochemicznych (IHC) istotnych dla ustalenia rozpoznania podtypu NSCLC. Podnoszą znaczenie zabezpieczenia odpowiedniej ilości materiału do dalszej diagnostyki molekularnej [1, 2].

Adres do korespondencji: dr n. med. Renata Langfort, Zakład Patomorfologii IGiChP, ul. Płocka 26, 01–138 Warszawa, tel.: (22) 431 22 57, faks (22) 431 24 27, e-mail: r.langfort@igichp.edu.pl

Praca wpłynęła do Redakcji: 4.09.2011 r.
Copyright © 2011 Via Medica
ISSN 0867–7077

Tabela 1. Zalecane postępowanie z drobnym materiałem biopsyjnym i cytologicznym w celu ustalenia rozpoznania typu pierwotnego niedrobnokomórkowego raka płuca (NSCLC)**Table 1. Management of small biopsies and cytology in subtyping of non-small cell lung carcinoma (NSCLC)**

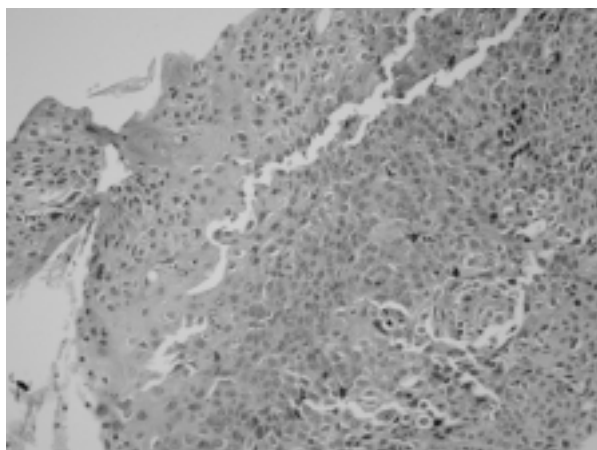
Kryteria morfologiczne oparte na barwieniu H+E, określone przez WHO (2004)

Barwienia histochemiczne (barwienie na śluz: mucykarmin, PAS + diastaza)

Diagnostyka IHC:

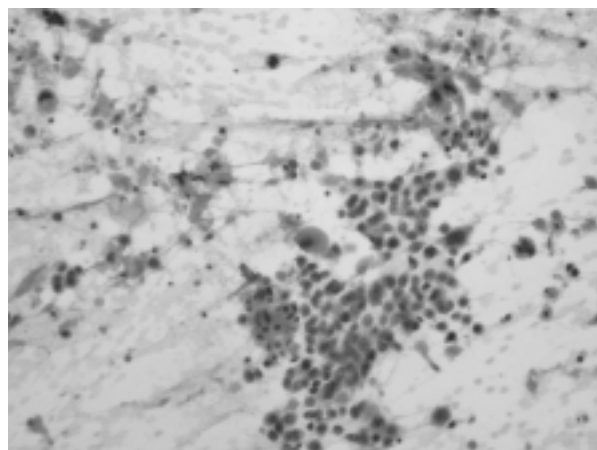
- markery różnicujące podtyp NSCLC (ADC v. SQCC)
 - TTF-1(+) ⇒ ADC
 - p63(+) ⇒ SQCC
 - TTF-1(-) i p63(-) ⇒ NSCLC-NOS
- markery neuroendokrynne (-) (NCAM/CD56, chromogranina A, synaptofizyna)
 - markery neuroendokrynne (+) ⇒ NSCLC, prawdopodobnie LCNEC

PAS — *Periodic acid Schiff*; LCNEC — rak wielkokomórkowy neuroendokrynnny płuca; NCAM — neural cell adhesion molecule; objaśnienia pozostałych skrótów w tekście



Rycina 1. Wycinek z bronchofiberoskopii. Fragmenty utkania raka płaskonabłonkowego z widocznym rogowaceniem (duże powiększenie). Barwienie H+E (preparat mikroskopowy ze zbiorów Zakładu Patomorfologii IGiChP)

Figure 1. Endobronchial biopsy. A small tissue sample with squamous cell carcinoma infiltration. Evident keratinization is seen (high magnification). H+E stain (microscopic slide from collection of Department of Pathology, National Tuberculosis and Lung Disease Research Institute)



Rycina 2. Rozmaz cytologiczny z biopsji transtorakalnej guza płuca. Widoczne są komórki raka niedrobnokomórkowego z cechami różnicowania płaskonabłonkowego (duże powiększenie). Barwienie H+E (preparat mikroskopowy ze zbiorów Zakładu Patomorfologii IGiChP)

Figure 2. Transthoracic biopsy. Cytology specimen shows non-small cell lung carcinoma with evident keratinization diagnostic of squamous cell carcinoma (high magnification). H+E stain (microscopic slide from collection of Department of Pathology, National Tuberculosis and Lung Disease Research Institute)

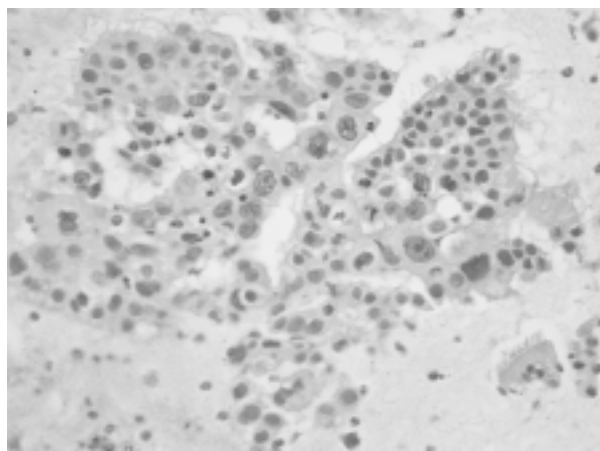
W badaniach cytologicznych wskazane jest wykonywanie małej liczby rozmazów i utrwalenie pozostałego aspiratu lub dodatkowe pobranie materiału w celu wykonania blozków parafinowych (tzw. *cell blocks*), które pozwalają na wykonanie większej liczby barwień dodatkowych, IHC oraz badań molekularnych [1].

Zgodnie z wprowadzonymi zaleceniami, w rakach, w których w standardowym barwieniu H+E występują morfologiczne cechy różnicowania płaskonabłonkowego lub gruczołowego, nie jest konieczne stosowanie barwień dodatkowych i reakcji IHC. Stwierdzenie rogowacenia i/lub mostków międzykomórkowych pozwala na rozpoznanie raka płaskonabłonkowego (ryc. 1, 2), na-

tomiast występowanie struktur gruczołowych, brodawkowatych lub wykrycie śluzu śródcytoplazmatycznego odpowiada rakowi gruczołowemu [3] (ryc. 3).

W przypadkach, w których w barwieniu H+E nie udaje się znaleźć cech różnicowania płaskonabłonkowego lub gruczołowego, jest konieczne wykonanie dodatkowych barwień histochemicznych (przede wszystkim w celu stwierdzenia obecności śluzu w cytoplazmie komórek raka), jak również reakcji IHC [1, 2].

Ze względu na małą ilość materiału, istotny jest wybór jak najmniejszej liczby odpowiednio dobranych przeciwciał, które pozwoliłyby na ustalenie rozpoznania.



Rycina 3. Materiał cytologiczny, tzw. *cell block*. Fragment utkanka raka gruczołowego. Widoczne tworzenie struktur gruczołowych (duże powiększenie). Barwienie H+E (preparat mikroskopowy ze zbiorów Zakładu Patomorfologii IGiChP)

Figure 3. Cytologic specimen – cell block with fragments of adenocarcinoma. Small glands are seen. (high magnification). H+E stain (microscopic slide from collection of Department of Pathology, National Tuberculosis and Lung Disease Research Institute)

Wskazane jest stosowanie jednego przeciwciała charakterystycznego dla ADC i jednego dla SQCC. Najbardziej polecanym zestawem jest przeciwciała przeciwko TTF-1 (*thyroid transcription factor 1*), specyficzne dla ADC i p63 dla SQCC [1, 2, 4]. Dodatnia reakcja jądrowa z TTF-1 przemawia nie tylko za różnicowaniem gruczołowym raka, ale także świadczy o jego pierwotnym płucnym pochodzeniu. Należy jednak pamiętać, że pozytywną reakcję z TTF-1 stwierdza się również w przerzutach raka tarczycy i niezwykle rzadko w innych rakach, między innymi trzonu macicy, piersi i jelita. W związku z tym prawidłowe rozpoznanie histopatologiczne zawsze wymaga korelacji z dokładnymi danymi klinicznymi dotyczącymi przeszłości onkologicznej chorego [2].

Wśród innych stosowanych reakcji IHC pozytywnych dla ADC wymienia się dodatnią ekspresję z cytokeratyną 7 (CK7), napsin-A, natomiast dla SQCC z cytokeratyną 5/6 (CK5/6). Inne przeciwciała wykorzystywane w diagnostyce raków płaskonabłonkowych, jak przeciwciała przeciwko cytokeratynie ciężkiej (CK34βE12) lub S100A7 są mniej czułe i mniej specyficzne [1, 2, 4] (tab. 2).

Informacja o wykonanych barwieniach dodatkowych i reakcjach IHC oraz interpretacja wyników wymagają umieszczenia w raporcie histopatologicznym [1].

W przypadkach, w których nie udaje się znaleźć morfologicznych cech różnicowania gruczołowego, natomiast stwierdza się dodatnią reakcję

Tabela 2. Najczęściej stosowane przeciwciała immunohistochemiczne (IHC) w określeniu podtypu raka niedrobnokomórkowego (NSCLC)

Table 2. The most frequently used immunohistochemical antibodies for subtyping non-small cell lung cancer

| Markery różnicowania gruczołowego | Markery różnicowania płaskonabłonkowego |
|-----------------------------------|---|
| TTF-1 | p63 |
| Napsin A | CK5/6 |
| CK7 | CK34βE12 |
| | DSC3 (<i>desmocollin-3</i>) |

przeciwko TTF-1 i/lub pozytywną reakcję z mucykarminem, a negatywną dla przeciwciał charakterystycznych dla raka płaskonabłonkowego, na przykład p63, nowotwór powinien być klasyfikowany jako „rak niedrobnokomórkowy prawdopodobnie gruczołowy” (ryc. 4A, B).

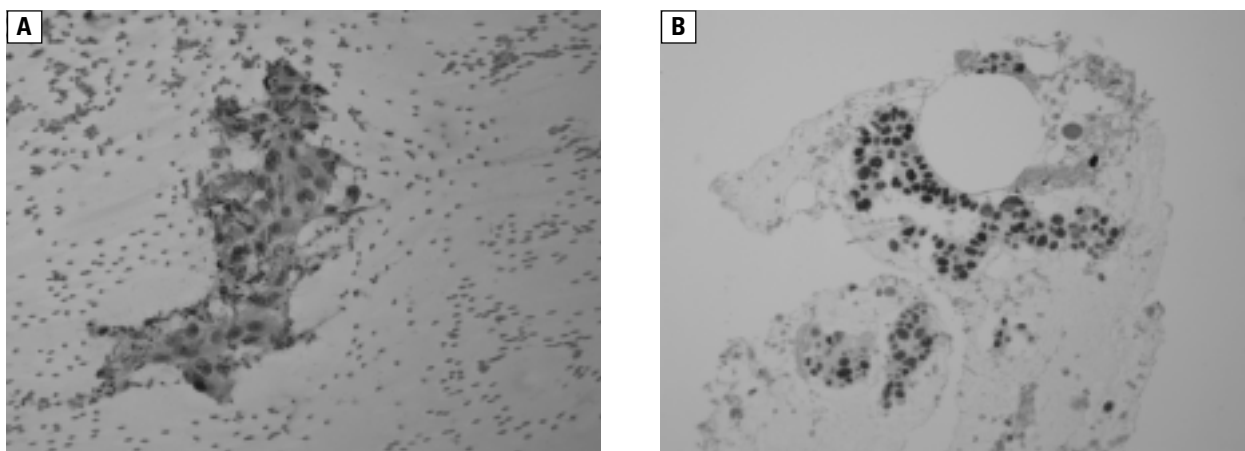
Raka, w którym w barwieniu H+E nie występuje różnicowanie płaskonabłonkowe, ale pojawia się dodatnia, przynajmniej średniointensywna i rozlana ekspresja przeciwciał charakterystycznych dla raka płaskonabłonkowego i negatywna dla gruczołowego i/lub ujemne barwienie na śluz należy określić mianem „raka niedrobnokomórkowego, prawdopodobnie płaskonabłonkowego” (ryc. 5A, B).

W przypadkach, w których stwierdza się dodatnią reakcję przeciwko TTF-1 lub innym przeciwciałom charakterystycznym dla raka gruczołowego oraz, w tych samych komórkach, pozytywną dla markera bądź markerów raka płaskonabłonkowego, rozpoznanie powinno brzmieć „rak niedrobnokomórkowy, prawdopodobnie gruczołowy”.

Jeśli ekspresja przeciwciał charakterystycznych dla raka gruczołowego (np. TTF-1) oraz dla raka płaskonabłonkowego (np. p63) jest pozytywna w różnych populacjach komórek raka, nowotwór powinien być sklasyfikowany jako NSCLC z sugestią różnicowania złożonego, czyli raka gruczołowo-płaskonabłonkowego (*adenosquamous carcinoma*).

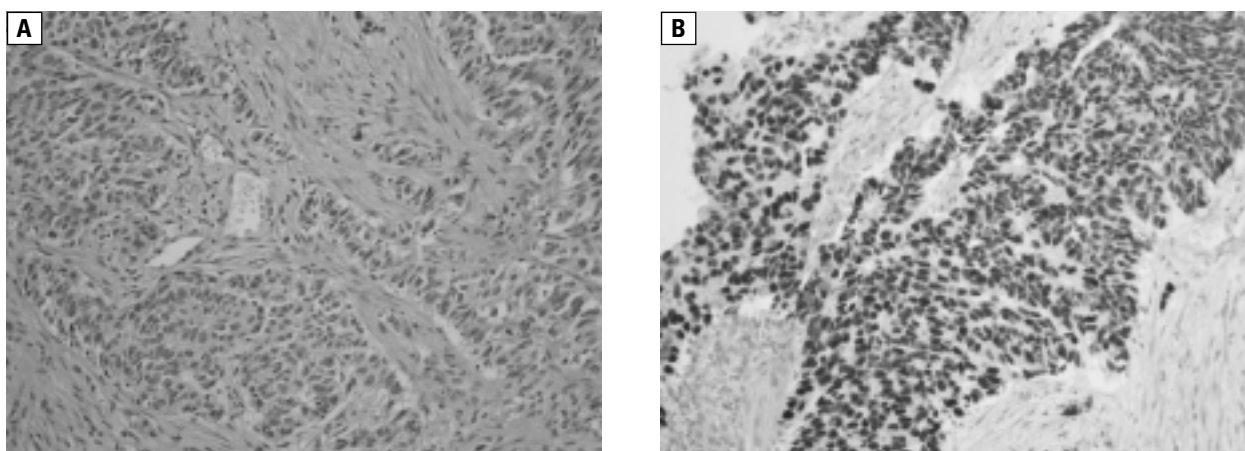
W przypadkach, w których nie stwierdza się cech morfologicznych różnicowania gruczołowego lub płaskonabłonkowego, jak również barwienia histochemiczne i reakcje IHC nie pozwalają na sprecyzowanie podtypu NSCLC, rak jest rozpoznawany jako niedrobnokomórkowy, bez możliwości określenia podtypu, czyli tak zwany NOS (*not otherwise specified*) [1, 2] (tab. 3).

Interpretacja reakcji IHC wymaga doświadczenia ze strony patologa oceniającego materiał, gdyż nie ma przeciwciał o 100-procentowej czułości i swoistości, konieczna jest korelacja z obrazem



Rycina 4 A, B. A — biopsja transtorakalna. Rozmaz cytologiczny z widocznym płatem komórek raka. Barwienie H+E; B — reakcja z TTF-1. Dodatnia reakcja w jądrach komórek raka przemawia za różnicowaniem gruczołowym — niedrobnokomórkowy rak płuca, prawdopodobnie gruczołowy (preparaty mikroskopowe ze zbiorów Zakładu Patomorfologii IGiChP)

Figure 4 A, B. A — Transthoracic biopsy. Cytology smear with non-small cell lung carcinoma. H+E stain; B — Carcinoma cells show positive nuclear reaction for TTF-1 suggesting an adenocarcinoma — non-small cell lung carcinoma, favor adenocarcinoma (microscopic slides from collection of Department of Pathology, National Tuberculosis and Lung Disease Research Institute)



Rycina 5 A, B. A — wycinek z bronchofiberoskopii. Rak nie wykazuje cech różnicowania płaskonabłonkowego lub gruczołowego. Barwienie H+E; B — reakcja IHC z p63. Wybitnie dodatnia reakcja w jądrach komórek raka przemawia za różnicowaniem płaskonabłonkowym — niedrobnokomórkowy rak płuca, prawdopodobnie płaskonabłonkowy (preparaty mikroskopowe ze zbiorów Zakładu Patomorfologii IGiChP)

Figure 5 A, B. A — endobronchial biopsy. Non-small cell lung carcinoma with no clear squamous or glandular differentiation. H+E stain; B — immunohistochemical reaction for p63. Diffuse, positive nuclear reaction of neoplastic cells for p63 suggests squamous differentiation — non-small cell lung carcinoma, favor squamous cell carcinoma (microscopic slides from collection of Department of Pathology, National Tuberculosis and Lung Disease Research Institute)

morfologicznym widocznym w barwieniu H+E. W wielu rakach gruczołowych płuca pojawia się dodatnia ekspresja z p63, antygenem charakterystycznym dla raka płaskonabłonkowego, co może być przyczyną błędnych rozpoznań; TTF-1 wykazuje większą specyficzność, wyjątkowo rzadko wypada dodatnio w rakach płaskonabłonkowych. W związku z tym w rakach, w których stwierdza się koekspresję p63 i TTF-1 w tych samych komórkach raka, przy braku morfologicznych cech różnicowa-

nia płaskonabłonkowego, nowotwór należy klasyfikować jako raka gruczołowego [1, 2].

Rozpoznanie raka gruczołowo-płaskonabłonkowego wymaga przebadania większej liczby wycinków [3]. Sugestia tej postaci NSCLC jest uzasadniona tylko wówczas, gdy w badaniu mikroskopowym wyraźnie zaznaczają się dwie różne populacje morfologiczne, bądź ekspresja TTF-1 i p63 występuje w odrębnych grupach komórek raka [1, 2]. Podobnie rozpoznanie raka wielkokomórkowe-

Tabela 3. Interpretacja obrazu morfologicznego, barwień histochemicznych i reakcji IHC w celu ustalenia podtypu raka niedrobnokomórkowego (NSCLC)**Table 3. Interpretation of morphological features, histochemical and immunohistochemical stains for subtyping non-small cell lung carcinoma**

| | |
|--|--|
| Morfologiczne cechy różnicowania płaskonabłonkowego widoczne w barwieniu H+E | Rak płaskonabłonkowy |
| Morfologiczne cechy różnicowania gruczołowego widoczne w barwieniu H+E | Rak gruczołowy |
| Brak morfologicznych cech różnicowania gruczołowego, barwienie na śluz dodatnie | Rak gruczołowy |
| Brak morfologicznych cech różnicowania gruczołowego lub płaskonabłonkowego, reakcje IHC: p63(+), TTF-1(–) | Rak niedrobnokomórkowy, prawdopodobnie płaskonabłonkowy |
| Brak morfologicznych cech różnicowania gruczołowego lub płaskonabłonkowego, reakcje IHC: p63(–), TTF-1(+) | Rak niedrobnokomórkowy, prawdopodobnie gruczołowy |
| Brak morfologicznych cech różnicowania gruczołowego lub płaskonabłonkowego, reakcje IHC: p63(–), TTF-1(–) | Rak niedrobnokomórkowy, bez możliwości określenia podtypu (NSCLC-NOS) |
| Cechy morfologiczne różnicowania neuroendokrynnego potwierdzone reakcjami IHC: markery neuroendokrynni (+) | Rak niedrobnokomórkowy, prawdopodobnie rak wielkokomórkowy neuroendokrynni |

Objaśnienia skrótów w tekście

go i postaci z różnicowaniem mięsakowatym jest możliwe tylko w materiale pooperacyjnym [1]. Przypadki, w których w badaniu histologicznym małych wycinków podejrzewa się postać wielkokomórkową lub raka mięsakowatego, należy klasyfikować jako raka niedrobnokomórkowego typu NOS. Raki, w których obok różnicowania pleomorficznego lub wrzecionowatokomórkowego pojawiają się cechy różnicowania płaskonabłonkowego bądź gruczołowego określa się niedrobnokomórkowym rakiem płuca, prawdopodobnie płaskonabłonkowym lub gruczołowym, w zależności od pojawiającego się komponentu [1, 2].

W sytuacjach, gdy obraz morfologiczny raka budzi podejrzenie różnicowania neuroendokrynnego, należy wykonać reakcje IHC z zastosowaniem markerów potwierdzających czynność neuroendokrynną nowotworu (CD56/NCAM, chromogranina A i/lub synaptofizyna). Dodatni wynik pozwala na rozpoznanie raka wielkokomórkowego neuroendokrynnego [1]. W rekomendacjach nie sprecyzowano, czy do rozpoznania tej postaci raka jest konieczna dodatnia reakcja z jednym czy kilkoma przeciwciałami, jednak ze względu na konieczność oszczędnego dysponowania materiałem, zabezpieczenie tkanki do dalszej diagnostyki molekularnej, wydaje się słuszne stosowanie jednego, najwyżej dwóch przeciwciał IHC.

Możliwości wykonania reakcji IHC mogą być limitowane zbyt skąpym materiałem, wówczas badania należy ograniczyć tylko do wykonania reakcji z TTF-1. Pozytywną reakcję z TTF-1 stwierdza się w większości raków gruczołowych płuca, natomiast wyjątkowo rzadko występuje w rakach płaskonabłonkowych, a jeśli pojawia się jest najczęściej słaba i ogniskowa [1, 2].

W przypadkach bardzo drobnych wycinków należy rozważyć zasadność wykonania barwień dodatkowych i reakcji IHC. Czasami korzystniejsze jest przekazanie materiału do dalszej diagnostyki molekularnej, bez ustalenia podtypu NSCLC, zwłaszcza jeśli nie ma możliwości ponownego pobrania wycinków [2]. Niekiedy wystarczająca może być sugestia NSCLC prawdopodobnie ADC lub SQCC.

Podsumowując, najistotniejsze wnioski wynikające z wprowadzonych rekomendacji przedstawiają się następująco:

1. W każdym przypadku rozpoznania NSCLC w małych wycinkach i materiale cytologicznym konieczne jest ustalenie podtypu raka, czyli ADC v. SQCC.
2. Gdy nie stwierdza się morfologicznych cech różnicowania gruczołowego lub płaskonabłonkowego w rutynowym barwieniu H+E, należy wykonywać barwienia histochemiczne (śluz) i IHC z wybranymi markerami. Zalecany panelem przeciwciał jest TTF-1-dodatnie w ADC i p63-dodatnie w SQCC.
3. Brak cech różnicowania płaskonabłonkowego lub gruczołowego w barwieniu H+E, negatywne barwienie na śluz oraz negatywne reakcje IHC wymagają stosowania rozpoznania NSCLC, bez możliwości określenia podtypu (NSCLC-NOS).
4. W przypadkach, w których wykonuje się biopsję diagnostyczną, wskazane jest wykonywanie kilku rozmazów cytologicznych i utrwalenie pozostałego materiału w celu wykonania blozków parafinowych, ewentualnie dodatkowe pobranie materiału igłą o grubszej średnicy.

Tabela 4. Rozpoznanie mikroskopowe kwalifikujące do oceny mutacji

Table 4. Tumors that are candidates for molecular testing

Rak gruczolowy płuca

Rak niedrobnokomórkowy, prawdopodobnie gruczolowy

Rak niedrobnokomórkowy bez możliwości określenia podtypu

5. Chorzy, u których ustalono rozpoznanie histopatologiczne:
 - rak gruczolowy płuca,
 - rak niedrobnokomórkowy prawdopodobnie gruczolowy,
 - rak niedrobnokomórkowy bez możliwości określenia podtypu (NOS), powinni być kwalifikowani do oceny mutacji (tab. 4).

Konflikt interesów

Autorzy nie zgłaszają konfliktu interesów.

Piśmiennictwo

1. Travis W.D., Brambilla E., Noguchi M. i wsp. International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society international multidisciplinary classification of lung adenocarcinoma. *J. Thorac. Oncol.* 2011; 6: 244–285.
2. Travis W.D., Rekhtman N. Pathological diagnosis and classification of lung cancer in small biopsies and cytology: strategic management of tissue for molecular testing. *Semin. Respirat. Crit. Care Med.* 2011; 32: 22–31.
3. Travis W.D., Brambilla E., Müller-Hermelink H.K. i wsp. Pathology and Genetics. Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart. IARC Press, Lyon 2004.
4. Kerr K.M. Distinction between adenocarcinoma and squamous cell carcinoma. *J. Thorac. Oncol.* 2011; (6 supl. 2): S156–S157.